

Minera Panamá

PROYECTO MINA DE COBRE PANAMÁ

ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL (EsIA)

CATEGORIA III

INFORME TRIMESTRAL DEL PROYECTO DE CONSERVACIÓN EX SITU DE ESPECIES DE INTÉRES DE ANFIBIOS

Compromisos de EsIA Aplicables	Período reportado	Elaborado por	Fecha de Emisión del Reporte
13202, 13207 13208, 13212 13221, 13223 13232, 13233	Febrero-Abril 2022	INSTITUTO SMITHSONIAN DE INVESTIGACIONES TROPICALES	4/29/2022

INFORME TRIMESTRAL DEL PROYECTO

“LA CONSERVACIÓN EX SITU DE RANAS DEL ÁREA DE DONOSO, RENOVACIÓN POR TRES AÑOS”

Período: Febrero-Abril 2022

Por: Roberto Ibáñez D., Proyecto de Rescate y Conservación de Anfibios de Panamá, Smithsonian Tropical Research Institute (STRI)

Fecha: 29 de abril de 2022

Introducción

El 1 de septiembre de 2019, Minera Panamá S.A. (MPSA) y el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) firmaron un acuerdo con el fin de extender el proyecto de conservación ex situ de anuros del área de Donoso por tres años. Con este acuerdo se continuarán los esfuerzos de conservación e investigación que contribuirán al manejo y preservación de los anfibios de Donoso, enfocándose en las especies de interés (EdI). Este proyecto es coordinado por el Proyecto de Rescate y Conservación de Anfibios de Panamá (PARC), que lleva a cabo las actividades de conservación ex situ dentro de instalaciones del STRI, ubicadas en Gamboa, provincia de Colón. En este informe se presentan los avances, de acuerdo a los objetivos acordados de este proyecto, realizados durante el período Febrero-Abril 2022.

Durante este trimestre, nosotros continuamos brindándole el todo cuidado requerido a las poblaciones de anfibios que mantenemos en el programa de conservación ex situ en Gamboa; al mismo tiempo, evitando o minimizando el riesgo de contagio del COVID-19 entre nuestros colaboradores. Estas actividades se realizaron siguiendo las indicaciones de las entidades de gobierno correspondientes y las medidas sanitarias sugeridas por el STRI. No obstante, las actividades que no están directamente vinculadas al cuidado y reproducción de los animales se mantuvieron suspendidas, como aquellas relacionadas con trabajo de campo. Estas actividades se tendrán que planificar y reprogramar próximamente.

Objetivo 1. – Mantener la instalación para la cría y reproducción de poblaciones en cautividad de las especies de anfibios de interés de Donoso.

Con relación a nuestra inversión en la capacitación de personal especializado en cría de anfibios, hemos realizado actividades. Tres estudiantes universitarios han continuado con sus investigaciones sobre técnicas de reproducción asistida en nuestras instalaciones para completar sus trabajos de graduación. La pasante Igli Arcia con estudios en medicina veterinaria, continuó participando y apoyándonos en la aplicación de técnicas de reproducción asistida y criopreservación de esperma de las ranas. Recibimos a nuestro primer voluntario post-pandemia y ya se cuenta con un segundo voluntario quien estará apoyándonos durante varias semanas. Reclutamos a dos colaboradores en el proyecto, los cuales fueron capacitados en el cuidado y reproducción de anfibios y en la producción de invertebrados.

Siete de los colaboradores del PARC tomaron el curso en-línea “Medicina, Etiología y Bienestar Animal en Anfibios”, del 25 al 27de abril de 2022, dictado por el Instituto Veterinario y de Ecología y certificado por el Consejo Nacional de Certificación en Medicina Veterinaria y Zootecnia de México.

Realizamos trabajos de mantenimiento y reparación de equipo en la instalación de Gamboa, principalmente relacionados al mantenimiento del generador eléctrico y de la planta de tratamiento de aguas residuales; además, se reemplazaron tubos de luces blancas, temporizadores eléctricos y todos los filtros de agua en los contenedores. En este trimestre, finalizó el trabajo de instalación del sistema de rociadores contraincendios en la pequeña edificación (150 m^2) para la producción de invertebrados. Actualmente, estamos a la espera del permiso de ocupación de este edificio, el cual debe ser emitido por la Oficina de Gestión de Seguridad, Salud y Ambiente del Instituto Smithsonian.

La producción de invertebrados ha continuado ininterrumpidamente en los salones temporales, ubicados en el área conocida como Santa Cruz. Continuamos produciendo grillos, dos especies de moscas de las frutas, colémbolos, larvas de polilla de despensa y polillas de cera (“waxworms”), lombrices de tierra, una especie de cucaracha, larvas de dos especies de escarabajos (“mealworms” y “superworms”), cochinillas y recolectando larvas de moscas soldado negro (familia Stratiomyidae) para alimentar a las poblaciones de anfibios en cautiverio. En estos meses, la producción de invertebrados sobrepasó el nivel requerido para alimentar a las ranas que mantenemos en Gamboa, lo cual es conveniente en caso de que ocurra alguna mortalidad inesperada de invertebrados y, aun así, poder cubrir las necesidades de alimentación de las ranas.

Los números de individuos de las poblaciones en cautiverio de las especies de anfibios del área de Donoso, que manteníamos al 28 de abril de 2022, en Gamboa eran:

Especie	Machos	Hembras	Juveniles	Total	Reproducción en cautiverio	Renacuajos
Andinobates geminisae	41	73	200	314	+	50
Atelopus varius	266	183	263	712	+	~1500
Craugastor evanesco	16	16	0	32	-	-
Gastrotheca cornuta	6	1	0	7	-	-
Oophaga vicentei	35	38	56	129	+	~50
Total	**364**	**311**	**519**	**1194**		**~1600**

Nota: *Craugastor evanesco* y *Gastrotheca cornuta* no presentan etapa de larvaria o renacuajo libre.

Al 29 de abril de 2022, teníamos 1194 ranas de cinco especies de anuros del área de Donoso. Entre las especies, que se mantienen en cautiverio, están cinco Especies de Interés (EdI) del Proyecto Mina de Cobre Panamá: *Andinobates geminisae*, *Atelopus varius*, *Craugastor evanesco, Gastrotheca cornuta* y *Oophaga vicentei*. En este trimestre, finalizamos la toma de muestras de piel ranas con hisopos para asegurarnos de que el hongo quitridio patógeno de anfibios no se encuentre dentro de nuestra instalación en Gamboa. Estas muestras están siendo analizadas y, en caso de que sea detectado, se tomarán las medidas correspondientes.

Para las especies *Andinobates geminisae*, *Craugastor evanesco* y *Oophaga vicentei* han sido colectados suficientes individuos fundadores con el fin de iniciar la población ex situ. Sin embargo, aún es recomendable obtener más individuos de *Atelopus varius* (6-10 hembras de la población en Nuevo Petaquilla) y *Gastrotheca cornuta* (14 machos y 19 hembras) para obtener una representatividad adecuada de su diversidad genética. La especie *G. cornuta* sido particularmente difícil de encontrar; por lo que, nos estaremos concentrando en la búsqueda de más individuos de esta especie. Esperamos reanudar expediciones en este año, con el fin de recolectar más fundadores de *G. cornuta*.

Durante este período, se mantuvieron 46 parejas de *Andinobates geminisae* en los tanques de reproducción, incluyendo parejas constituidas por individuos de la segunda generación filial (F2) nacidos en cautiverio. Entre estas parejas hubo varios eventos de reproducción. Resultado de estos eventos reproductivos, para el final del período, se tenían 50 renacuajos y 314 juveniles. Adicionalmente, mantuvimos 35 parejas de *Oophaga vicentei* durante este período. Hemos encontrado unos 50 renacuajos de *O. vicentei*, algunos en los receptáculos de las plantas bromelias artificiales, al final de este período. Continuamos con el tratamiento tópico de las hembras reproductoras de *O. vicentei* con gotas de gluconato de calcio y el uso de agua reconstituida filtrada por ósmosis inversa para criar a los renacuajos, con el propósito de reducir la aparición del síndrome de patas débiles (SLS) en los post-metamorfos. Síndrome que no les permite moverse con normalidad para alimentarse y, como consecuencia, mueren. En este período, no hubo post-metamorfos de *Oophaga vicentei* que presentasen el SLS. Se obtuvieron unos 23 juveniles sanos de *O. vicentei*, incluyendo juveniles que pertenecen a la segunda generación filial (F2) nacidos en cautiverio.



Individuo de *Craugastor evanesco*, proveniente del río Uvero, bajo tratamiento antimicótico.

Se mantuvieron 16 parejas de adultos de *Craugastor evanesco* en tanques para su reproducción. En este período, se limpiaron sus tanques, se redujo el tiempo de exposición a la luz UVB y se les renovó el sustrato para la puesta de huevos. Estos cambios se realizaron con la intención de facilitar su reproducción. No se realizaron los ensayos con tratamientos hormonales en esta especie durante el trimestre. Adicionalmente, se recibieron cuatro individuos provenientes del área de Donoso, rescatados del río Ubero, los cuales no se contabilizaron en el cuadro anterior. Estos individuos se encuentran en cuarentena, a quienes se les ha aplicado el tratamiento preventivo, de 10 días de duración, contra el hongo quitridio y se ha iniciado la primera desparasitación.

En el trimestre Febrero-Abril, inició la salida de post-metamorfos de los tanques con renacuajos de las dos puestas de *Atelopus varius* reportadas en el trimestre antepasado (i.e., Noviembre-puestas. Además, durante Febrero-Abril, se colocaron nueve parejas en tanques de reproducción, de las cuales dos parejas se estimularon hormonalmente. Tres de las parejas

depositaron huevos y tenemos renacuajos de ellas. Adicionalmente, la fecundación *in vitro* de los oocitos de dos hembras utilizando esperma fresco resultó en huevos viables que se desarrollaron y actualmente se tienen renacuajos de ambas. Al final del presente período, manteníamos un total aproximado de 1500 renacuajos de *A. varius.*

Como parte de los preparativos para un experimento en el laboratorio y un ensayo de liberación con *Atelopus varius*, hemos realizado cruces de individuos cuyo linaje proviene de poblaciones de tierras bajas (i.e., Donoso) con individuos de linaje proveniente de poblaciones de tierras altas. El número de individuos resultantes de los cruces para este experimento no se incluyen en el cuadro antes presentado. Durante Febrero-Abril, se colocaron cuatro parejas en tanques de reproducción, de las cuales sólo dos parejas depositaron huevos. Sin embargo, solamente se tienen renacuajos y post-metamorfos descendientes de una de las parejas. Con este experimento y ensayo de liberación determinaremos si una mayor diversidad genética de los individuos confiere una mayor resistencia o tolerancia al hongo patógeno de anfibios, *Batrachochytrium dendrobatidis*.



Hembra "grávida" de *Atelopus varius*, cargada de oocitos, lista para ser introducida con un macho en un tanque de reproducción.

Además, se mantuvo una pareja de *Gastrotheca cornuta* en un tanque para su reproducción. Sin embargo, a pesar de que se les había estado alimentando de manera asistida y la hembra estuvo grávida por varios meses, no se reprodujeron. A finales de este trimestre, se decidió separar a esta pareja y mantenerlos separados temporalmente. A través de estos intentos y eventos reproductivos, seguimos conformando paulatinamente poblaciones estables en cautiverio de las especies EdI de Donoso. En este sentido, para las especies que se han reproducido con mayor frecuencia, *Atelopus varius*, *Andinobates geminisae* y *Oophaga vicentei*, tenemos individuos fundadores (parentales) y descendientes de la primera generación filial (F1) y la segunda generación filial (F2) en las poblaciones de éstas en cautiverio. En el caso de *Craugastor evanesco* y *Gastrotheca cornuta*, solamente se tienen parentales y descendientes F1.

Durante este período, se preparó y sometió el protocolo del proyecto PARC para el manejo de los anfibios ante el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) del STRI, ya que es un prerrequisito para todos los proyectos en los que se manipularán y manejarán animales vertebrados en el Instituto Smithsonian. El protocolo del proyecto PARC fue aprobado por este comité, tal como se indica en el certificado correspondiente (Anexo 1). Adicionalmente, se ha continuado con la introducción de datos de los individuos de Donoso en la base de datos “Zoological Information Management System” (ZIMS) (http://www2.isis.org), lo cual facilita el manejo del inventario de animales, el control de la conformación genética y demográfica de las colecciones de animales vivos, la identificación de animales no relacionados para realizar cruces, el mantenimiento de un registro del estado de salud y el tratamiento que se le ha dado a cada individuo, entre otros.



Hembra de *Andinobates geminisae* nacida en cautiverio (F1) que alcanzó la etapa adulta y se transfirió a un tanque para su reproducción.

Objetivo 2. – Continuar el trabajo para ensayos de liberación de anfibios en el área de Donoso.

En este trimestre, se realizaron preparativos para continuar con el proyecto piloto para probar el tipo de mesocosmo que será utilizado en liberaciones suaves (“soft releases”) y determinar cuál es la densidad de individuos más adecuada para los ensayos de liberación de ranas *Atelopus varius.* Decidimos probar solamente un tipo de mesocosmo para contener a las ranas durante liberaciones suaves, que según la primera prueba resultó ser el mejor cualitativamente (i.e.,

Purrfect Pen). En donde se mantendrán individuos de *A. varius* a tres densidades (i.e., 1, 3 y 6 individuos) con tres réplicas para cada densidad. Ya se ha hecho una preselección de los 30 individuos que serán utilizados y se cuenta con la aprobación de la modificación al protocolo por parte el IACUC (i.e., Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales) del STRI. Estamos a la espera del pedido adicional de mesocosmos que se necesitan para replicar este ensayo, el cual requiere de 9 mesocosmos.

Se continuaron los análisis de los hisopados de piel del experimento de infección, relacionados a las investigaciones sobre las secreciones de la piel ("mucosoma") de los anfibios. Nuestro colaborador Dr. Luke Linhoff, becario postdoctoral del Instituto Smithsonian, viajó a los EE.UU. pero regresó nuevamente a Panamá, a finales de abril, para continuar y completar los ensayos *in vitro* de las secreciones de la piel de las ranas. Como se indicó en informes trimestrales anteriores, los resultados de estas investigaciones sobre las secreciones de la piel de los anfibios pueden tener implicaciones importantes para la liberación exitosa de ranas provenientes de poblaciones en cautiverio.

Objetivo 3. – Realizar expediciones para recolectar ciertas especies de anfibios en riesgo en el área de Donoso.

Durante este período nosotros no realizamos expediciones para recolectar individuos. Como se indicó en informes anteriores, *Gastrotheca cornuta* es una Especie de Interés (EdI), de la cual se requieren más individuos fundadores para establecer adecuadamente una población ex situ en Gamboa. Esperamos realizar una expedición al sitio 4CS6, o a sitios cercanos a la costa, próximamente.

Objetivo 4. - Estudio de los hongos patógenos de anfibios en la región de Donoso.

Debido a que no realizamos expediciones a Donoso en este trimestre; sin embargo, obtuvimos muestras de piel para el análisis del hongo patógeno de anfibios, *Batrachochytrium dendrobatidis*, de los cuatro individuos de *Craugastor evanesco* que fueron colectados en el río Ubero, Donoso.

Anexo 1. Certificado de aprobación del protocolo del proyecto PARC, por parte el IACUC (i.e., Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales) del STRI, para el manejo de los anfibios.



STRI Animal Care and Use Committee (ACUC)
Approval Letter

Date Proposal Received: 03/30/2022 07:57:57 PM EDT
Proposal Title: Panama Amphibian Rescue and Conservation
Principle Investigator(s): Roberto Ibanez
Collaborator (s): Brian Gratwicke, Jorge Guerrel, Nancy Fairchild, Jennifer Warren, Orlando Garces, Lanki Chuecarma, Paolo Pinzon, Yimayri Figueroa, Estefany Illueca, Amarnato Cabezon, Kenia Cabezon, Gina Della Tonga, Matthew Evans, Eric Baitchman, Bryan Windmiller, Nicole Chaney, Diorene Smtih, Eric Klaphake, Liza Dadone, Dionel Rodriguez, Kenia Rodriguez, Diego Samaniego, Denise Mariscal, Igli Arcia, Yineska Otero, Allan Pessier, Brad Wilson, Pierre Comizzoli.
Proposal Number: SI-22027
Proposal Expiration Date: 04/04/2025
Proposal Materials Complete: Yes
Review Process Determination: Approved

Comments:
Your protocol has been approved. We would like to stress the importance of reporting changes in your research or any problems you encounter during your research period.

Approval Date of Record: 04/05/2022

Important Notes:

Please notify the STRI ACUC in writing immediately if problems develop in association with your project. If you intend to make significant changes to your study including changes to methodology, study species, personnel, or project title, you must submit a STRI ACUC amendment form.

The STRI ACUC conducts semi-annual site inspections, during which your project is subject to review. At the end of each year of your project, we require that you submit an annual report summarizing the results of your project, the number of animals used, and any unforeseen events including animal injuries or deaths. Please also include successes or shortcomings of the methodology used. You will receive automated reminders to submit. If you fail to submit your annual report, your protocol will become inactive until your annual report is received.

Please be advised that it is your responsibility to obtain all permits and/or authorizations from the Panamanian government that are required to conduct this research or to import or export any biological samples.

Rachel Page

Rachel Page

STRI ACUC Chair